

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 4749—2025

饲料中7种大环内酯类药物的测定
液相色谱-串联质谱法

Determination of seven macrolides in feeds—
Liquid chromatography-tandem mass spectrometry

2025-04-27 发布

中华人民共和国农业农村部 发布



前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由农业农村部畜牧兽医局提出。

本文件由全国饲料工业标准化技术委员会(SAC/TC 76)归口。

本文件起草单位：江苏省农业科学院。

本文件主要起草人：龚兰、魏瑞成、王冉、栾枫婷、陈明、邵雪梅、刘传辉、朱磊、唐敏敏、张莉莉、段玲、袁驴军。



饲料中 7 种大环内酯类药物的测定

液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件描述了饲料中 7 种大环内酯类药物的液相色谱-串联质谱测定方法。

本文件适用于配合饲料、浓缩饲料、精料补充料、添加剂预混合饲料和混合型饲料添加剂中螺旋霉素(以螺旋霉素 I 计)、阿奇霉素、替米考星、红霉素(以红霉素 A 计)、泰乐菌素(以泰乐菌素 A 计)、克拉霉素和罗红霉素等 7 种大环内酯类药物的测定。

本文件的检出限为 0.02 mg/kg,定量限为 0.05 mg/kg。

2 规范性引用文件

下列文件中内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中,注日期的引用文件,仅该日期对应的版本适用于本文件;不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 20195 动物饲料 试样的制备

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

试样中的待测物用氨化乙腈提取,经固相萃取柱净化,用液相色谱-串联质谱仪测定,基质匹配标准溶液校准,外标法定量。

5 试剂或材料

除非另有规定,仅使用分析纯试剂。

5.1 水:符合 GB/T 6682 规定的一级水。

5.2 甲醇:色谱纯。

5.3 乙腈:色谱纯。

5.4 甲酸:色谱纯。

5.5 10%甲醇溶液:取 100 mL 甲醇,加水稀释至 1 000 mL,混匀。

5.6 1%氨化乙腈溶液:取 10 mL 氨水,加乙腈稀释至 1 000 mL,混匀。

5.7 氢氧化钠溶液(5.0 mol/L):称取 100 g 氢氧化钠,溶解于 500 mL 水中,混匀。

5.8 磷酸盐缓冲溶液(0.1 mol/L, pH=9.0±0.4):准确称取 6.80 g 磷酸二氢钾,溶于水中,加水至约 480 mL,用 5.0 mol/L 氢氧化钠(5.7)调节 pH 至 9.0±0.4,用水定容至 500 mL,混匀。

5.9 5%氨化甲醇溶液:取 5 mL 氨水,加甲醇稀释至 100 mL,混匀。

5.10 0.1%甲酸水溶液:取 1 mL 甲酸(5.4),加水稀释至 1 000 mL,混匀。

5.11 0.1%甲酸乙腈溶液:取 1 mL 甲酸(5.4),加乙腈稀释至 1 000 mL,混匀。

5.12 标准储备溶液(1 mg/mL):准确称取螺旋霉素 I、阿奇霉素、替米考星、红霉素 A、泰乐菌素 A、克拉霉素和罗红霉素标准品或对照品各 10 mg(纯度等按附录 A 执行),精确至 0.01 mg,分别于 10 mL 容量瓶中,用甲醇(5.2)溶解,定容,混匀。于-18℃以下保存,有效期 3 个月。

5.13 混合标准中间溶液(1 μg/mL):准确移取各标准储备溶液(5.12)0.1 mL 于 100 mL 容量瓶中,用

10%甲醇溶液(5.5)稀释至刻度,混匀,备用。于2℃~8℃下保存,有效期1周。

5.14 混合标准系列工作溶液:准确移取适量体积的混合标准中间溶液(5.13),用10%甲醇溶液(5.5)稀释配制成质量浓度分别为2 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL、200 ng/mL混合标准系列工作溶液。临用现配。

5.15 固相萃取柱:氮乙炔吡咯烷酮与二乙烯基苯共聚物的混合型反相填料,200 mg/6 mL。

5.16 微孔滤膜:0.22 μm,有机系。

6 仪器设备

6.1 液相色谱-串联质谱仪:配有电喷雾离子源。

6.1 分析天平:精度0.01 g和0.01 mg。

6.1 涡旋混合器。

6.1 超声波清洗器。

6.1 离心机:转速不低于8 000 r/min。

6.1 氮吹仪。

6.1 固相萃取装置。

6.1 酸度计:精度±0.01。

7 样品

按GB/T 20195的规定制备试样,至少200 g,粉碎使其全部通过0.425 mm孔径的试验筛,充分混匀,装入密闭容器中,备用。选取与待测样品类型相同,均匀一致,且在待测物保留时间处仪器响应值小于方法定量限30%的饲料样品,作为基质空白样品。

8 试验步骤

8.1 提取

平行做2份试验。称取2 g(精确至0.01 g)试样于50 mL离心管中,准确加入10 mL 1%氯化乙腈溶液(5.6),涡旋混合1 min,超声提取20 min,其间充分摇动2次,于8 000 r/min离心5 min,取上清液于另一个50 mL离心管中;于残渣中加入10 mL 1%氯化乙腈溶液(5.6),重复提取一次,合并上清液,准确移取1 mL上清液,于40℃下氮吹至近干,加入5 mL磷酸盐缓冲溶液(5.8)溶解残渣,涡旋混合1 min,备用。

8.2 净化

依次用5 mL甲醇(5.2)、5 mL水和5 mL磷酸盐缓冲溶液(5.8)活化固相萃取柱(5.15),将备用液(8.1)全部过柱,用5 mL水淋洗,真空负压抽干,用6 mL 5%氯化甲醇溶液(5.9)洗脱,收集洗脱液,真空负压抽干后,洗脱液于40℃下氮吹至近干,准确加入1 mL 10%甲醇溶液(5.5)溶解残渣,涡旋混匀,过微孔滤膜(5.16),待测。

8.3 基质匹配混合标准系列溶液的制备

取基质空白样品,按8.1和8.2处理至“洗脱液于40℃下氮吹至近干”,准确加入1 mL混合标准系列工作溶液(5.14)溶解残渣,涡旋混匀,过滤膜(5.16),配制成质量浓度为2 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL和200 ng/mL的基质匹配混合标准系列溶液,待测。

8.4 测定

8.4.1 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件如下:

a) 色谱柱:C₁₈柱,柱长100 mm,内径2.1 mm,粒径1.7 μm;或性能相当者;

b) 柱温:40℃;

- c) 流速:0.3 mL/min;
 d) 进样量:2 μ L;
 e) 流动相:A相为0.1%甲酸水溶液(5.10),B相为0.1%甲酸乙腈溶液(5.11),梯度洗脱程序见表1。

表1 梯度洗脱程序

时间 min	A相 %	B相 %
0.00	90	10
1.00	90	10
2.00	80	20
5.00	50	50
6.00	10	90
7.00	10	90
7.01	90	10
12.00	90	10

8.4.2 质谱参考条件

质谱参考条件如下:

- a) 电离方式:电喷雾电离,正离子模式(ESI⁺);
 b) 检测方式:多反应监测(MRM);
 c) 喷雾电压:5.5 kV;
 d) 雾化温度:500 $^{\circ}$ C;
 e) 多反应监测(MRM)离子对、去簇电压及碰撞能量参考值见表2。

表2 多反应监测(MRM)离子对、去簇电压及碰撞能量参考值

被测物名称	监测离子对 <i>m/z</i>	去簇电压 V	碰撞能量 eV
螺旋霉素 I	843.6/174.2 ^a	160	43
	843.6/540.5	160	41
阿奇霉素	749.5/591.3 ^a	60	28
	749.5/158.0	60	37
替米考星	869.5/696.3 ^a	38	59
	869.5/174.3	38	58
红霉素 A	734.3/576.3 ^a	76	27
	734.3/158.2	76	36
泰乐菌素 A	916.5/174.1 ^a	87	49
	916.5/772.3	87	40
克拉霉素	748.5/158.0 ^a	50	36
	748.5/590.4	50	27
罗红霉素	837.4/158.2 ^a	74	43
	837.4/679.4	74	30

^a 为定量离子。

8.4.3 基质匹配标准系列溶液和试样溶液测定

在仪器的最佳条件下,分别取基质匹配标准系列溶液(8.3)和试样溶液(8.2)上机测定。基质匹配标准溶液的定量离子色谱图见附录B。

8.4.4 定性

在相同试验条件下,试样溶液与基质匹配标准系列溶液中待测物的保留时间相对偏差应在 $\pm 2.5\%$ 之内。根据表2选择的定性离子对,比较试样谱图中待测物定性离子的相对离子丰度与浓度接近的基质匹配标准系列溶液中对应的定性离子的相对离子丰度,若偏差不超过表3规定的范围,则可判定为样品中存在对应的待测物。

表 3 定性测定时相对离子丰度的最大允许偏差

单位为百分号

相对离子丰度	>50	>20~50	>10~20	≤10
最大允许偏差	±20	±25	±30	±50

8.4.5 定量

以基质匹配标准系列溶液中待测组分的质量浓度为横坐标、色谱峰面积为纵坐标,绘制标准曲线。标准曲线的相关系数应不低于 0.99。试样溶液与基质匹配标准溶液中待测物的响应值均应在仪器检测的线性范围内。如超出线性范围,应重新测定。单点校准定量时,试样溶液中待测物的峰面积与基质匹配标准溶液的峰面积相差不超过 30%。

9 试验数据处理

试样中待测物的含量以质量分数 w_i 表示,单位为毫克每千克(mg/kg)表示。多点校准按公式(1)计算;单点校准按公式(2)计算。

$$w_i = \frac{\rho \times V \times V_2}{V_1 \times m \times 1000} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

- ρ ——由基质匹配标准曲线查得的试样溶液中待测物质量浓度的数值,单位为纳克每毫升(ng/mL);
- V ——试样提取溶液总体积的数值,单位为毫升(mL);
- V_2 ——8.2 项下氮吹至近干后复溶试样溶液体积的数值,单位为毫升(mL);
- V_1 ——净化用试样提取溶液体积的数值,单位为毫升(mL);
- m ——试样质量的数值,单位为克(g);
- 1 000 ——换算系数。

$$w_i = \frac{A \times c_s \times V \times V_2}{A_s \times V_1 \times m \times 1000} \dots\dots\dots (2)$$

式中:

- A ——试样溶液中待测物的色谱峰面积;
- c_s ——基质匹配标准溶液中待测物质量浓度的数值,单位为纳克每毫升(ng/mL);
- A_s ——基质匹配标准溶液中待测物的色谱峰面积;
- 1 000 ——换算系数。

测定结果以平行测定的算术平均值表示,保留 3 位有效数字。

10 精密度

在重复性条件下,2 次独立测定结果与其算术平均值的绝对差值不大于该算术平均值的 20%。

附 录 A
(规范性)

7 种大环内酯类药物中英文通用名称、化学分子式、CAS 号和纯度

7 种大环内酯类药物中英文通用名称、化学分子式、CAS 号和纯度见表 A.1。

表 A.1 7 种大环内酯类药物中英文通用名称、化学分子式、CAS 号和纯度

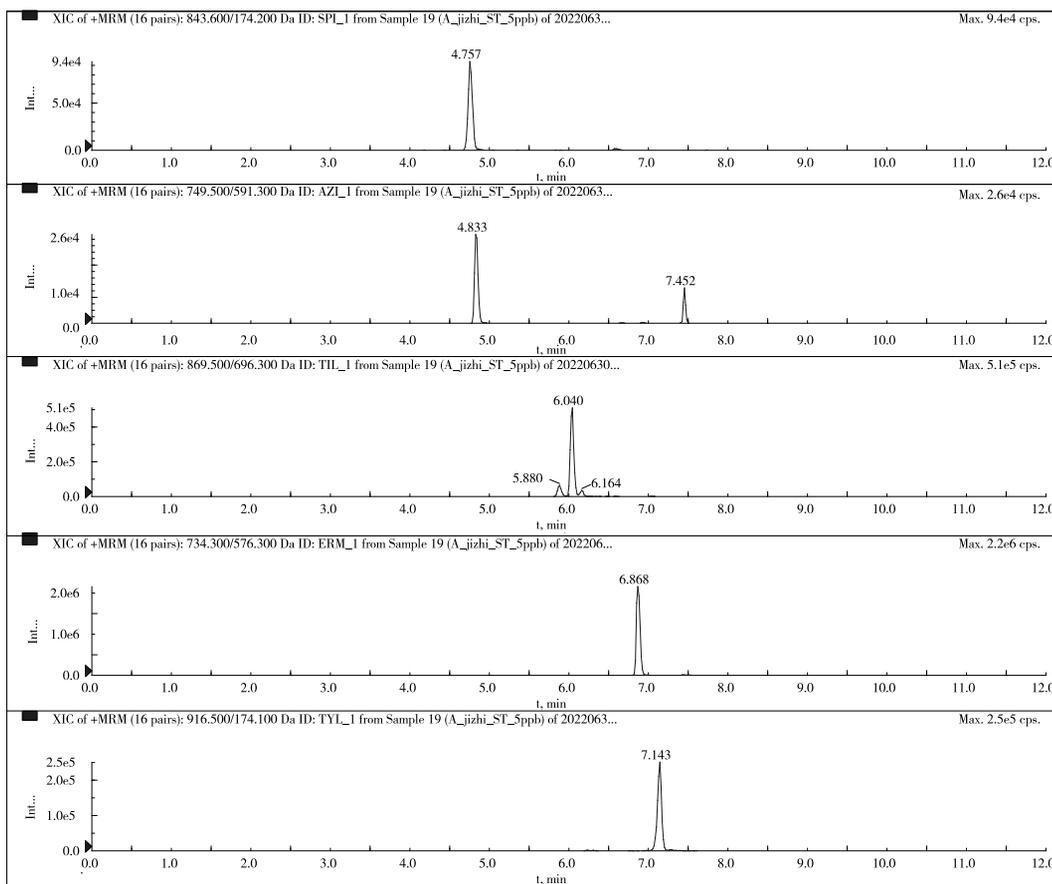
中文通用名称	英文通用名称	化学分子式	CAS 号	纯度, %
螺旋霉素 I	Spiramycin I	$C_{43}H_{74}N_2O_{14}$	24916-50-5	≥ 99.0
阿奇霉素	Azithromycin	$C_{38}H_{72}N_2O_{12}$	83905-01-5	≥ 99.0
替米考星	Tilmicosin	$C_{46}H_{80}N_2O_{13}$	108050-54-0	≥ 99.0
红霉素 A	Erythromycin A	$C_{37}H_{67}NO_{13}$	114-07-8	≥ 99.6
泰乐菌素 A	Tylosin A	$C_{46}H_{77}NO_{17}$	1401-69-0	≥ 98.0
克拉霉素	Clarithromycin	$C_{38}H_{69}NO_{13}$	81103-11-9	≥ 99.0
罗红霉素	Roxithromycin	$C_{41}H_{76}N_2O_{15}$	80214-83-1	≥ 99.0

附录 B

(资料性)

7 种大环内酯类基质匹配标准溶液定量离子色谱图

7 种大环内酯类基质匹配标准溶液(5 ng/mL)定量离子色谱图见图 B.1。



标引序号说明:

- | | |
|-------------|------------|
| 1——螺旋霉素 I ; | 5——泰乐菌素 A; |
| 2——阿奇霉素; | 6——克拉霉素; |
| 3——替米考星; | 7——罗红霉素。 |
| 4——红霉素 A; | |

图 B.1 7 种大环内酯类基质匹配标准溶液(5 ng/mL)定量离子色谱图